

**INDUCTION OF APOPTOSIS IN THE ABSENCE OF
CASPASE-3 BY THE FLAVONE VR-3623 IN
HUMAN BREAST CANCER CELL LINE**

ORAWIN PRANGSAENGTONG

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PHYSIOLOGY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005**

**ISBN 974-04-5574-3
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

การเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสโดยไม่ต้องอาศัยเอนไซม์แคสเพส-3 โดยสารฟลาโวน-วีกัวร์ 3623 ในเซลล์มะเร็งเต้านมคน (INDUCTION OF APOPTOSIS IN THE ABSENCE OF CASPASE-3 BY THE FLAVONE VR-3623 IN HUMAN BREAST CANCER CELL LINE)

อรวินท์ พ่วงแสงทอง 4336197 SCPS/M

วท.ม. (สรีรวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : กุลวิทย์ สุจริต, Ph.D., สมัยศึก โสภาสรรค์, Ph.D., สุขชิตา อุบล, Ph.D.

บทคัดย่อ

ปัจจุบันได้มีรายงานทางระบาดวิทยา แสดงถึงความสัมพันธ์ของการบริโภคสารประเภท ฟลาโวนอยที่พบในเต้าหู้และถั่วเหลือง กับการลดอัตราการเกิดโรคมะเร็งเต้านมเป็นจำนวนมากขึ้น การทดลองในครั้งนี้เพื่อมุ่งศึกษากลไกของสารวีกัวร์-3623 ที่มีผลต่อการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งเต้านมของคนที่ MCF-7) สารวีกัวร์-3623 เป็นสารสกัดบริสุทธิ์ประเภทฟลาโวนที่แยกมาจากใบและกิ่งของพืชสมุนไพรไทยต้นการ์ดิเนีย ออบทูซิโฟเลีย จากการศึกษาพบว่าเซลล์มะเร็งเต้านมที่ได้รับสารวีกัวร์-3623 ที่ 4 ความเข้มข้น คือ 0.8, 2, 4 และ 8 ไมโครโมลาร์ (ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ GI_{50} 2.5, 5 และ 10 เท่าของ GI_{50} ของสารวีกัวร์-3623) เป็นเวลานาน 3-72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ MCF-7 ถูกเหนี่ยวนำให้ตายแบบอะพอพโทซิสมากขึ้นตามความเข้มข้น และระยะเวลาของการทำการทดลอง ซึ่งลักษณะของเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิสสามารถประเมินได้จากการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสของเซลล์ด้วยการย้อมด้วยสารเรืองแสง DAPI (DAPI staining) และดูการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของการถูกย่อยของเอนไซม์โพลีเอดีพี-ไรโบส โพลีเมอเรส (PARP) หลังจากที่เซลล์ได้รับสารวีกัวร์-3623 ที่ความเข้มข้น 8 ไมโครโมลาร์ พบว่าจำนวนเซลล์ที่ตายแบบอะพอพโทซิส มีเพิ่มมากขึ้น และเมื่อย้อมเซลล์ด้วยสารเรืองแสงแล้วจะเห็นเซลล์ที่มีสายโครมาตินรวมตัวกันแน่นและมีการแตกตัวเป็นชิ้นเล็ก ๆ ของดีเอ็นเอ ซึ่งมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 8 จนถึงระดับที่มากที่สุดที่ร้อยละ 66 ที่เวลา 3 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ นอกจากนี้การทำเวสเทอรัลบลอตพบชิ้นส่วนของ PARP ที่ถูกย่อยขนาด 85 kDa ในช่วงเวลา 24-72 ชั่วโมง ซึ่งบ่งชี้ถึงการเกิดอะพอพโทซิส เนื่องมาจากเอนไซม์แคสเพสในช่วงเวลาดังกล่าวเพื่อศึกษาความเกี่ยวข้องของเอนไซม์แคสเพสกับการทำให้เกิดการตายของเซลล์โดยสารวีกัวร์-3623 ได้ใส่ตัวยับยั้งเอนไซม์แคสเพสชนิดรวม (Z-VAD-FMK) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนที่เซลล์จะได้รับสารวีกัวร์-3623 ที่ความเข้มข้น 8 ไมโครโมลาร์ พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงตัวยับยั้งเอนไซม์แคสเพสชนิดรวมไปยับยั้งการตายของเซลล์ได้ร้อยละ 13 และสามารถยับยั้งการย่อยของ PARP ได้อย่างสมบูรณ์ จากการวัดระดับของเอนไซม์แคสเพส 9 และ 7 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นผ่านการหลั่งของไซโตโครมซีจากไมโทคอนเดรียโดยใช้สารเรืองแสงพบว่าเอนไซม์ทั้งคู่อุบัติขึ้นให้สูงขึ้นและมีค่าเพิ่มมากที่สุดที่ 48 ชั่วโมงหลังจากการได้รับสาร แต่ระดับของคลาสเพส 9 และ 7 มีปริมาณน้อยตลอดการทดลอง และระดับของเอนไซม์แคสเพสทั้งคู่อุบัติขึ้นโดยตัวยับยั้งที่จำเพาะต่อชนิดของคลาสเพสชนิดนั้น ๆ ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครโมลาร์ จากการศึกษาการหลั่งของโปรตีนไซโตโครมซีและเอไอเอฟจากไมโทคอนเดรียสู่ไซโตพลาสซึมโดยการทำเวสเทอรัลบลอต พบว่าโปรตีนไซโตโครมซี (15 kDa) และเอไอเอฟ (57 kDa) ถูกหลั่งออกมาที่เวลา 24 ชั่วโมงและระดับของโปรตีนทั้งสองมีปริมาณเพิ่มมากที่สุดที่เวลา 48 ชั่วโมงหลังจากการได้รับสารวีกัวร์-3623 จากข้อมูลทั้งหมดข้างต้นสรุปได้ว่าสารวีกัวร์-3623 ยับยั้งการเจริญเติบโตของมะเร็งเต้านมของคนที่ (MCF-7) โดยเหนี่ยวนำให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิสโดยผ่านเอนไซม์แคสเพส-7และสารเอไอเอฟ นอกจากนี้เอนไซม์แคสเพส-3 ไม่ใช่ปัจจัยที่สำคัญที่สารฟลาโวนตัวนี้ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์มะเร็งเต้านม (MCF-7) คน

INDUCTION OF APOPTOSIS IN THE ABSENCE OF CASPASE-3 BY THE FLAVONE VR-3623 IN HUMAN BREAST CANCER CELL LINE

ORAWIN PRANGSAENGTONG 4336197 SCPS/M

M.Sc. (PHYSIOLOGY)

THESIS ADVISORS: KULAWEE SUJARIT, Ph.D., SAMAISUKH SOPHASAN, Ph.D., SUKATIDA UBOL, Ph.D.

ABSTRACT

A growing body of epidemiologist studies have shown that increased flavonoid consumption such as tofu and soybean is associated with a reduced risk of breast cancer. In the present study, the mechanism of antiproliferative activity of VR-3623 (5,3'-dihydroxy-3,6,7,8,4'-pentamethoxyflavone, DPMF) was investigated in human MCF-7 breast cancer cells *in vitro*. VR-3623 is a flavone compound isolated from the leaves and twigs of a Thai tropical plant, *Gardenia obtusifolia*. Treatment of MCF-7 cells with 4 concentrations, 0.8 μM (GI_{50}), 2 μM ($2.5\times\text{GI}_{50}$), 4 μM ($5\times\text{GI}_{50}$) and 8 μM ($10\times\text{GI}_{50}$) of VR-3623 for 3-72 hours resulted in a dose-and time-dependent increased apoptotic cells as evaluated by 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) staining and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage. After incubation with 8 μM VR-3623, the number of apoptotic cells characterized by chromatin condensation and DNA fragmentation after nuclear staining increased from 8% to the maximum level 66% as observed at 3 and 72 hours, respectively. In addition, Western blot analysis showed the expression of the proteolytic cleavage of PARP (85 kDa), an indicative sign of apoptotic cells, during 24-72 hours. To investigate the involvement of caspase enzyme in DPMF-mediated cell death, cells were preincubated with the general caspase inhibitor, Z-VAD-FMK (10 μM), 1 hour before the addition of 8 μM of the flavone. The results at 48 hours of incubation showed that the general caspase inhibitor could alleviate cell death by 13%, but completely prevent the cleavage of PARP. To further examine the caspases that contribute in DPMF-mediated apoptosis in caspase-3-deficient MCF-7 cells, caspase-9 and -7 activities in the apoptotic cells were determined using a fluorogenic assay. The findings showed that both caspases were activated and increased to the maximum levels at 48 hours after treatment, but the levels of activities were low throughout the experiments. The activity of both caspases was inhibited by 15 μM of their specific peptide inhibitors, Ac-LEHD-CHO for caspase-9 and Ac-DQTD-CHO for caspase-7. Furthermore, the release of cytochrome c and apoptosis-inducing factor (AIF) from the mitochondria into the cytosol was detected to see the role of mitochondria in this apoptosis. Western blot analysis demonstrated the expression of two proteins, cytochrome c (15 kDa) and AIF (57 kDa) at 24 hours and the maximum values at 48 hours after incubation. It is concluded that VR-3623 may suppress the growth of MCF-7 cells by induction of apoptosis through caspase-dependent pathway via caspase-7 activation and caspase-independent pathway via AIF release. In addition, caspase-3 may not be essential in DPMF-induced apoptosis in caspase-3-deficient MCF-7 cells.

KEY WORDS: DPMF / APOPTOSIS / CASPASE-7 / AIF / MCF-7 CELL

134 P. ISBN 974-04-5574-3